

MASTER 2 BIOLOGIE SANTE  
MENTION IMAGERIE CELLULAIRE  
PROMOTION 2015/2016

Rapport de stage Master2 :

**Utilisation de nanoparticules harmoniques pour le suivi cellulaire en microscopie biphotonique, application à la thérapie cellulaire de la myopathie de Duchenne**

Solenne FRADET

Maîtres de stage :

Dr Laurence DUBREIL et Dr Karl ROUGER

Lieu de stage : UMR 703 INRA Oniris

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire  
et de l'Alimentation Nantes-Atlantique

44307 Nantes

Période d'accueil : du 20 février au 28 juillet 2017

MASTER 2 BIOLOGIE SANTE  
MENTION IMAGERIE CELLULAIRE  
PROMOTION 2015/2016

Rapport de stage Master2 :

**Utilisation de nanoparticules harmoniques pour le suivi  
cellulaire en microscopie biphotonique, application à la  
thérapie cellulaire de la myopathie de Duchenne**

Solenne FRADET  
Maîtres de stage :  
Dr Laurence DUBREIL et Dr Karl ROUGER  
Lieu de stage : UMR 703 INRA Oniris  
Ecole Nationale Vétérinaire,  
Agroalimentaire et de l'Alimentation  
Nantes-Atlantique 44307 Nantes  
Période d'accueil : du 20 février au 28 juillet 2017

# SOMMAIRE

## Remerciements

## Résumé

## Introduction ..... 1

### I) Contexte dans lequel s'inscrit le stage

I-1) Présentation de la structure d'accueil

I-2) Contexte scientifique

I-3) Objectifs du stage

## Matériel et méthodes ..... 4

### I) Matériel

I-1) Nanoparticules harmoniques BFO Bismuth Ferrite

I-1-1) Définition et génération des signaux d'harmoniques

I-1-2) Description des nanoparticules d'harmoniques BFO

I-2) Cellules hMuStem

I-2-1) Préparation des cellules

I-2-2) Expression des facteurs myogéniques chez les cellules hMuStem.

I-3) Expérimentation animale

I-3-1) Injection intramusculaire des cellules hMuStem chez la souris

### II) Méthodes

II-1) Etude de l'effet des nanoparticules sur le comportement des cellules MuStem

II-1-1) Etude de la motilité des cellules par vidéomicroscopie

II-1-2) Etude de l'expression des facteurs myogéniques par immunocytochimie

II-1-3) Etude de la différenciation cellulaire par immunocytochimie

II-1-4) Acquisition en microscopie biphotonique

II-2) Suivi des cellules hMuStem dans le muscle, 24h post-administration chez la souris

II-2-1) Immunomarquage de la lamine A/C et détection des nanoparticules en microscopie biphotonique

## Résultats .....14

### I) Effet des nanoparticules sur la motilité des cellules hMuStem

### II) Effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques

### III) Effet des nanoparticules sur la différenciation cellulaire

### IV) Tracking des cellules hMuStem et des nanoparticules dans le muscle de souris

## Discussion et Conclusion .....24

## Références bibliographiques .....27

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le GDRMIV pour avoir attribué une bourse AMI à la plateforme APEX de l'UMR703 destinée à soutenir l'accueil d'un stagiaire de **Master M2** dans le cadre d'un stage interdisciplinaire dont la base méthodologique ou l'investigation scientifique elle-même, ont pour cadre la microscopie du vivant. J'ai pu grâce à ce financement bénéficier d'un encadrement multidisciplinaire, en biologie cellulaire dans l'équipe de recherche de Karl ROUGER et en microscopie sur la plateforme APEX, encadrée par Laurence DUBREIL.

J'adresse mes remerciements à Mr Karl ROUGER pour m'avoir intégré dans son équipe de recherche tout au long de ce stage et m'avoir confié les cellules hMuStem pour que je puisse les marquer et les tracer dans le muscle chez la souris.

Je remercie Isabelle LEROUX et Cindy SCHLEDER pour m'avoir formé à la culture cellulaire et aux marquages en immuno-histochimie.

Je remercie Mme Laurence DUBREIL responsable de la composante bio-imagerie de la plateforme APEX, pour m'avoir encadré tout au long de ce stage et fait part de ses connaissances en microscopie et en biologie. Mais également pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie ensuite Romain FLEURISSON pour m'avoir été mon tuteur technique en microscopie biphotonique et pour son aide précieuse dans l'analyse des images.

Je remercie également Mme Chantal THORIN pour nous avoir apporté son expertise en bio statistiques pour ce qui concerne l'analyse des données « cytoo ».

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Et enfin je remercie Mme Delphine BUREL, directrice du Master IMACELL pour m'avoir donnée l'opportunité d'intégrer ce cursus universitaire.

## Résumé

Mots clés : Myopathie de Duchenne, Cellules souches, Nanoparticules, Motilité cellulaire, Microscopie biphotonique.

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cellules en thérapie cellulaire, il est primordial d'élaborer et de valider des outils pour surveiller le comportement des agents thérapeutiques suite à leur administration. Ici, nous utilisons des nanoparticules harmoniques d'oxyde de fer et de bismuth (BFO HNPs) pour marquer les cellules hMuStem, des cellules souches dérivées du muscle squelettique humain amplifiées *in vitro* et qui représentent un candidat prometteur pour le traitement des patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Au cours de cette étude, nous démontrons que les nanoparticules ont peu d'effets sur la motilité cellulaire et que ces mêmes nanoparticules n'ont pas de conséquences significatives sur l'expression des facteurs myogéniques et sur la différenciation des cellules musculaires. Ces résultats confortent les études précédentes qui ont démontré que les nanoparticules n'avaient pas d'effet cytotoxique sur les cellules hMuStem. Nous avons également confirmé qu'il était possible de détecter les nanoparticules harmoniques localisées dans les cellules hMuStem marquées, *in situ* dans le muscle de la souris, 24 heures après leur administration. Ces résultats sont encourageants pour les études à venir sur la biodistribution des cellules hMuStem administrées par voie systémique chez les modèles animaux de la Myopathie de Duchenne.

## Abstract

Key words: Duchenne Muscular Dystrophy, Stem cells, Nanoparticles, Cell motility, Biphotonic microscopy.

In order to assess the therapeutic potential of cell based strategies, it is of paramount importance to elaborate and validate tools for monitoring the behavior of injected cells in terms of tissue dissemination and engraftment properties. Here, we apply bismuth ferrite harmonic nanoparticles (BFO HNPs) to *in vitro* expanded human skeletal muscle-derived stem cells (hMuStem cells), an attractive therapeutic avenue for patients suffering from Duchenne muscular dystrophy (DMD). In this work, we demonstrated that the nanoparticles have low effects on the cell motility and that the nanoparticles have no significant consequences on the myogenic factor expression and on the muscular cell differentiation. These results are in accordance with the previous studies which demonstrated that the nanoparticles have no cytotoxic effects on the hMuStem cells. We have also confirmed that it was possible to detect harmonic nanoparticles localized in labeled hMuStem *in situ* in the mouse muscle 24 hours after the administration. These results are encouraging for future studies on the biodistribution of hMuStem cells following systemic administration in animal models of Duchenne Muscular Dystrophy.

## Liste des abréviations, sigles et acronymes :

BFO: Bismuth ferrite oxyde

DMD: Dystrophie Musculaire de Duchenne

GaAsP: Gallium arsenide phosphide detector

HNPs: Harmonic Nanoparticules

PEG: Polyethylene glycol

PMT: Photomultiplicateur

SHG: Second Harmonic Generation

THG: Third Harmonic Generation

MDSC: myeloid-derived suppressor cells

NIR: Near Infra-Red

# Introduction

## I) Contexte dans lequel s'inscrit le stage

### I-1) Présentation de la structure d'accueil

La structure d'accueil de ce stage est une structure mixte de recherche sous la tutelle de l'INRA et d'Oniris. Les activités de l'UMR703 PAnTher se focalisent sur la Physiopathologie Animale et la Biothérapie du muscle et du système nerveux. Ses principales activités se répartissent entre deux grands axes:

L'un concerne la recherche et la mise en place de stratégies thérapeutiques pour traiter la myopathie de Duchenne sous la direction de Karl ROUGER.

Le second concerne la mise en place de stratégies thérapeutiques pour traiter les maladies neuro-dégénératives et plus particulièrement la maladie de Pompe et l'Amyotrophie Spinale sous la direction de Marie-Anne COLLE.

Les stratégies thérapeutiques sont validées sur des modèles animaux de petite taille (modèle murins) et de grande taille (chiens, primates non humains) avec pour objectif de conforter les protocoles développés et de mettre en place progressivement des essais précliniques chez l'homme.

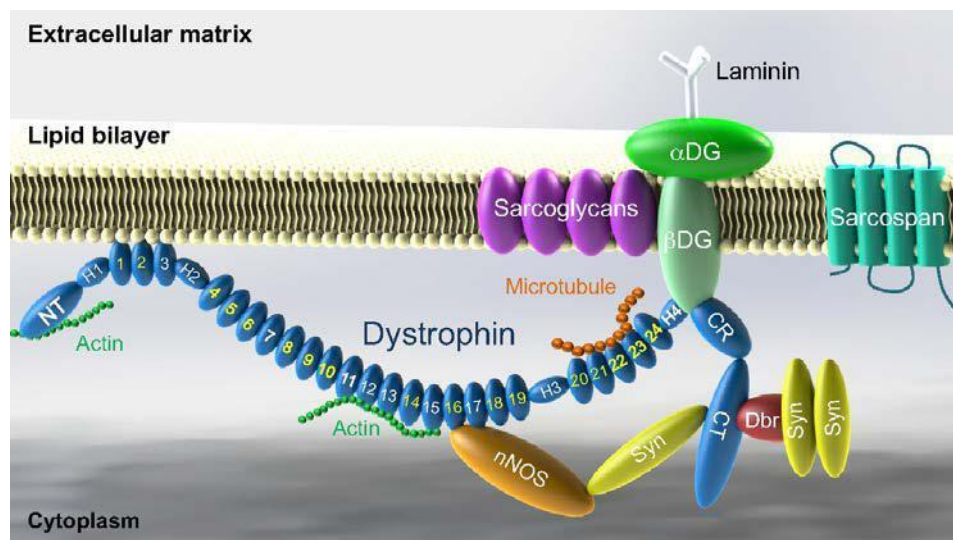
De plus, est adossée à l'UMR703, une plateforme d'expertise en histopathologie et bio-imagerie de fluorescence. La plateforme APEX animée par Thibault LARCHER pour la composante "pathologie vétérinaire" et par Laurence DUBREIL pour la composante "Bio-imagerie de Fluorescence", ouverte aux académiques et entreprises, apporte également un véritable soutien aux activités de recherche de l'UMR703.

### I-2) Contexte scientifique

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie autosomale récessive liée au chromosome X et de ce fait se déclare uniquement chez les garçons à raison de 1 garçon atteint sur 5000 naissances.

Cette pathologie liée à la mutation du gène codant la dystrophine a pour principales conséquences d'entraîner progressivement une faiblesse musculaire, et une faiblesse cardiaque avec une mort prématurée des patients vers l'âge de 30 ans.

La dystrophine est située sous la membrane du sarcolemme et possède deux domaines principaux de liaisons l'un en N-terminal qui lui permet de se fixer à l'actine et l'autre en C-terminal qui lui permet de se fixer au complexe DAPC (voir Figure 1).



**Figure 1 :** Représentation de l'organisation de la Dystrophine et de ses protéines associées dans le sarcolemme.

<http://dmm.biologists.org/content/8/3/195>

L'absence de dystrophine entraîne une perte d'intégrité membranaire, une succession de cycles nécrose – régénération et une atrophie musculaire progressive générale est observée. Le tissu musculaire dystrophique est le siège d'une réaction inflammatoire et il sera progressivement remplacé par un tissu fibreux et adipeux. La DMD atteint un garçon nouveau-né sur 5000 et reste aujourd'hui sans traitement curatif, avec un décès des patients entre 20 et 30 ans. Parallèlement à des stratégies pharmacologiques qui visent à ralentir l'évolution de la pathologie, des approches de thérapie cellulaire et génique font aujourd'hui partie des axes thérapeutiques prometteurs (Govoni et al, 2013).

L'UMR 703 a identifié et caractérisé une population de cellules souches musculaires adultes sur la base d'une propriété d'adhérence tardive, par un protocole de préplating. Cette population, nommée cMuStem (c pour canin), est capable d'auto-renouvellement et de



différenciation en myocytes, ostéocytes et adipocytes. Le laboratoire a montré que l'administration de ces cellules MuStem ralentit la dégradation du phénotype clinique général des chiens myopathes (Rouger et al, 2011).

Suite à la validation thérapeutique de ces cellules souches adultes musculaires sur le modèle canin de DMD, l'équipe de Karl Rouger a cherché à isoler et caractériser une population cellulaire similaire chez l'homme et ceci à partir de biopsies musculaires de donneurs sains. Les hMuStem sont maintenant bien caractérisées en termes de pouvoir prolifératif et de phénotype. Elles ont été administrées chez la souris et il a été démontré qu'elles étaient capables d'apporter la dystrophine humaine dans le muscle de souris (Thèse de Judith Lorant, 2016). Compte tenu de ces résultats, ces cellules hMustem constituent de véritables candidates thérapeutiques pour traiter la myopathie de Duchenne chez l'Homme. Il est cependant indispensable d'avoir des informations sur la biodistribution des cellules hMuStem post-administration avant de pouvoir les proposer en préclinique.

C'est dans ce contexte scientifique que l'UMR a développé une collaboration avec Luigi Bonacina de l'Université de Genève et Sandrine Gerber de l'Ecole Polytechnique de Lausanne, tous deux impliqués dans le développement de nouvelles nanoparticules constituées de Bismuth et d'oxyde de Fer (BFO) capables de pénétrer facilement dans les cellules et susceptibles d'être imagées dans les tissus de par leur brillance détectable en microscopie biphotonique. Une première étude a consisté à montrer que les cellules hMuStem étaient capables d'internaliser les nanoparticules harmoniques BFO sans avoir d'effets négatifs sur la prolifération cellulaire et que ces nanoparticules pouvaient être ensuite imagées dans le muscle injecté avec les cellules hMuStem chargées de nanoparticules (Dubreil et al., 2017).

### I-3) Objectifs du stage

L'objectif principal de ce stage est la mise en place de tests permettant de valider l'effet cytotoxique ou non des nanoparticules sur les cellules hMuStem et de confirmer la possibilité d'imager les cellules hMuStem in situ dans les muscles chez la souris et ceci 24 heures après leur administration. Deux paramètres d'évaluation de l'effet des

nanoparticules sur les cellules ont été analysés, (i) l'effet des nanoparticules sur la motilité des cellules hMuStem, (ii) l'effet des nanoparticules sur la différenciation cellulaire par le suivi de l'expression des facteurs myogéniques dans les cellules en absence et en présence de nanoparticules.

## Matériel et Méthodes

### I Matériel

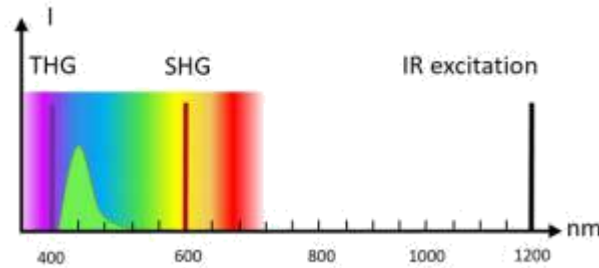
#### I-1) Les nanoparticules harmoniques BFO

##### I-1-1) Définition et génération des signaux d'harmoniques

Les signaux harmoniques de seconde (SHG) et troisième harmonique (THG) sont des phénomènes optiques qualifiés de non linéaires et agissent ainsi comme source de contraste. Les signaux harmoniques sont générées uniquement à partir d'une excitation multiphotonique, biphotonique pour les signaux de SHG et triphotonique pour les signaux de THG ceci implique l'utilisation d'un laser pulsé femtoseconde. Lorsque l'excitation est multiphotonique Le diagramme de Jablonski classique est modifié comme illustré en figure 2. Les molécules biologiques qui produisent majoritairement des signaux de SHG sont le collagène fibrillaire de type 1 et la myosine car elles ne présentent pas de centrosymétrie (Débarre et al., 2006). La THG est générée au niveau des interfaces (air/eau, eau/lipide) due aux différences d'indices permettant d'imager les vésicules lipidiques, les adipocytes dans un tissu (Débarre et al., 2006).

La réponse de ces signaux est très fine et précise ce qui permet de les distinguer comparativement à l'émission de fluorescence d'un fluorochrome suite à une excitation biphotonique (figure 2).

Les nanoparticules harmoniques BFO développées par Luigi Bonacina et utilisées pour marquer les cellules dans le cadre de l'étude seront clairement identifiées dans les cellules et/ou le tissu car elles produisent à la fois des signaux de SHG et THG (Bonacina, 2012).

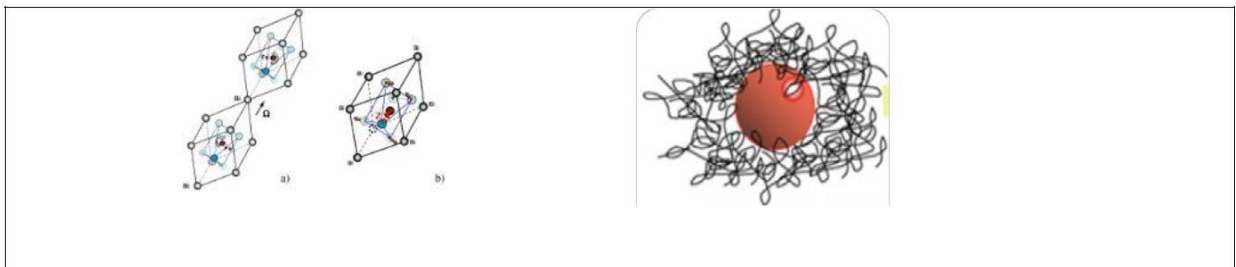


**Figure 2 :** Diagramme de Jablonski simplifié avec représentation des signaux SHG dans le jaune, THG dans le bleu et l'émission de fluorescence dans le vert à partir d'une source d'excitation multiphotonique à la longueur d'onde 1200 nm (Illustration tirée du livre Microscopy and imaging science, Editor: A. Méndez-Vilas p293-299)

)

### I-1-2) [Description des nanoparticules harmoniques BFO](#)

Les nanoparticules BFO constituées de Ferrite et de Bismuth, utilisées pour marquer les cellules hMuStem ont été conçues par Luigi Bonacian physicien à l'Université de Genève et fonctionnalisées par Sandrine GERBER, chimiste à l'Ecole Polytechnique de Lausanne (figure 3).



**Figure 3 :** a-b, Schéma représentant l'agencement des cristaux de Bismuth-Ferrite. c, Les nanoparticules greffées avec un groupement polyéthylèneglycol. La taille des nanoparticules oscille entre 100 et 120 nm. (Bonacina et al., 2012)

Le choix de ces nanoparticules est motivé par la nécessité d'imager les cellules sur une profondeur maximale et de pouvoir différencier sans difficulté le signal très brillant des nanoparticules du bruit endogène généré par le tissu. Les BFO du fait de leur structure sont capables de générer simultanément des signaux de seconde et troisième harmonique, très brillants et très stables ne présentant aucune contrainte pour la longueur d'onde d'excitation (figure 4). Les BFO sont des outils très intéressants pour suivre des cellules marquées dans le tissu animal (i) parce qu'elles peuvent être imagées sans ambiguïté dans

dans des tissus autofluorescents du fait de leur forte brillante, indépendante de la fluorescence (ii) parce que leurs doubles propriétés harmoniques (SHG+THG) les rendent distinctes des structures biologiques capables de générer uniquement de la SHG (collagène) et/ou uniquement de la THG (tissu adipeux) (Dubreil et al., 2017).



**Figure 4 :** Représentation de l'émission des signaux de SHG et THG par les nanoparticules [www.nccr-must.ch/highlight/wolf\\_bonacina\\_352016.html](http://www.nccr-must.ch/highlight/wolf_bonacina_352016.html)

Des molécules de polyéthylène glycol ont été greffées sur les nanoparticules BFO par l'équipe de Sandrine Gerber de l'EPFL afin d'améliorer leur internalisation dans les cellules (Bonacina et al., 2012) et réduire leur cytotoxicité (Staedlher et al, 2015)

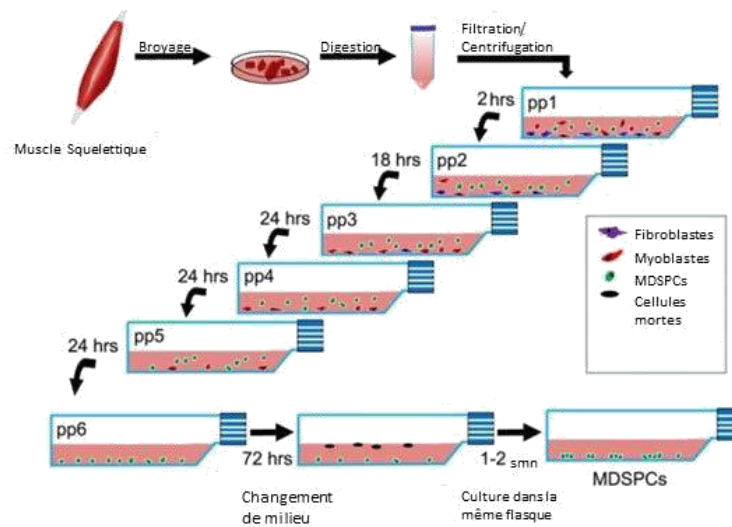
## I-2) [Les cellules hMuStem](#)

### I-2-1) [Identification des cellules hMuStem](#)

Les cellules hMuStem ont été extraites à partir de biopsies musculaires en provenance de 4 donneurs sains (tableau 1) selon le protocole décrit dans la figure 5.

Identification des lots de cellules hMuStem	Age du donneur	Type de muscle
34	18 ans	Paravertébral
53	13 ans	Paravertébral
69	15 ans	Paravertébral
71	15 ans	Paravertébral

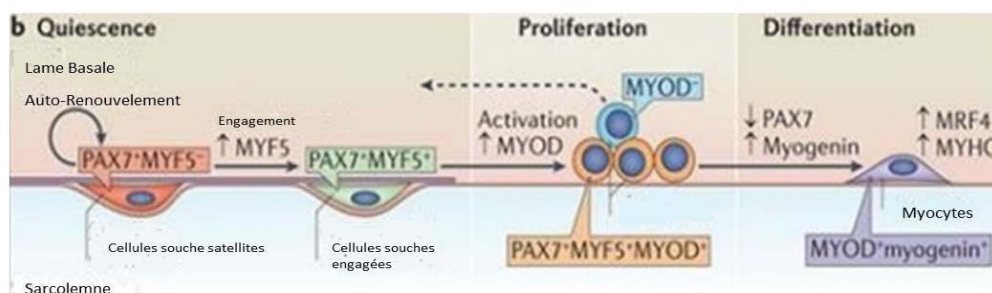
**Tableau 1 :** identification des lots de cellules hMuStem isolés à partir de muscles paravertébraux



**Figure 5 :** Isolement de cellules souches et progéniteurs cellulaires dérivés du muscle squelettique humain[k1] (thèse de Florence ROBRIQUET 2015)

### I-2-2) Expression des facteurs myogéniques chez les cellules hMuStem

Au cours de leur différenciation myogénique, les cellules hMuStem expriment de façon séquentielle et progressive les facteurs myogéniques Pax7, Myf5 MyoD et la myogénine notée MyoG par la suite. Pax7 est le facteur de détermination myogénique tandis que Myf5 et MyoD sont des facteurs de régulation de la myogenèse. Myogénine et myosine sont quant à eux des marqueurs de l'engagement dans la phase de différenciation.

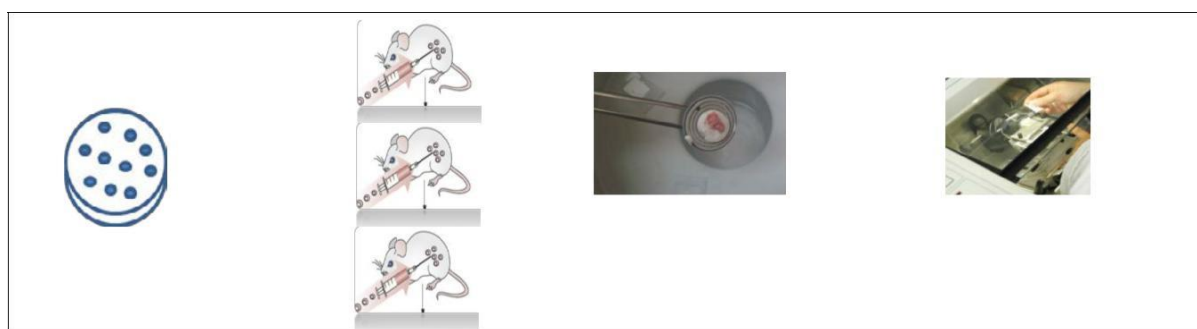


**Figure 6 :** Schéma représentant l'activation séquentielle des facteurs génétiques exprimés par les précurseurs myogéniques. (Wang and Rudnicki, 2012)

### I-3) Expérimentation animale

#### I-3-1) Injection intramusculaire des cellules hMuStem chez la souris

Trois souris âgées de 3 mois (souris souche 129) ont été anesthésiées avec une injection intrapéritonéale (0,1 ml/20 g de poids corporel) d'une solution contenant 100 mg/ml de kétamine (Merial, Lyon, France) et 20 mg / mL Rompun 2% (Bayer, Puteaux, France). Des injections intramusculaires de cellules hMuStem ont été effectuées dans le tibial cranial et le muscle gastrocnémien (250 000 cellules par injection, remises en suspension dans 15 µl de PBS, injection à J4 avec 12,5 µg/ml de nanoparticules). Les souris sont euthanasiées 24 heures après les injections. Les muscles injectés sont prélevés et congelés dans l'isopentane refroidit avec de l'azote liquide. Un tibial de souris injectée est directement fixé dans le PFA dans l'objectif de réaliser des observations sur muscle entier transparisé.



**Figure 7 :** Injection intramusculaire des cellules hMuStem chez la souris, congélation et coupes au cryostat

## II Méthodes

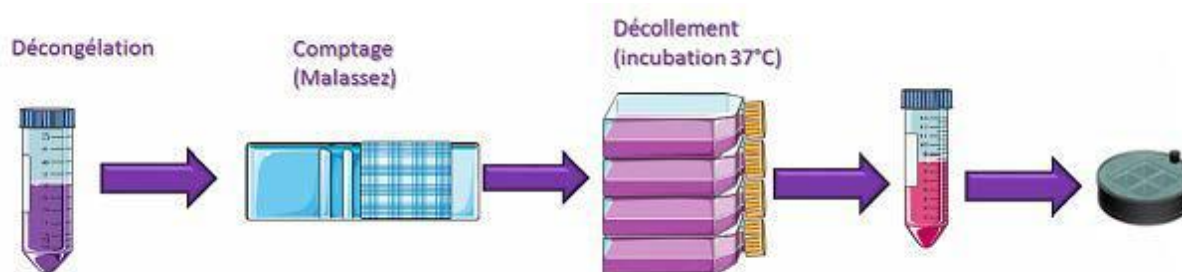
### II-1) Etude de l'effet des nanoparticules sur le comportement des cellules hMuStem

#### II-1-1) Etude de la motilité des cellules par vidéomicroscopie

##### II-1-1-1) Préparation des cellules

Les cellules sont cultivées dans un milieu de prolifération (composition non divulguée pour des raisons de valorisation). La densité cellulaire est alors de 5 000 cellules /cm<sup>2</sup>.

Trois ou quatre jours plus tard les cellules sont mises en contact 1 nuit avec les nanoparticules (12,5 µg/ml). Le surnageant de culture est ensuite remplacé par du milieu de culture frais (figure 8) .

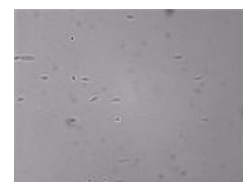
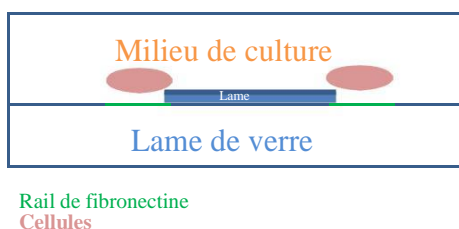


**Figure 8 :** Schéma détaillant la procédure de préparation des lamelles Cytoo

Les lots cellulaires analysés sont numérés et 100 µl de suspension cellulaire sont déposés à la même concentration (**3000 cellules pour 100 uL**) sur des lamelles de verres recouvertes de rails de 20 µm de large contenant de la fibronectine (Lamelle Cytoo (19.5 mmX19.5 mm) de la société, Miratec (Grenoble), La chambre cytoo séparée en quatre compartiments peut contenir 4 échantillons différents. (cf figure 9)



Chambre Cytoo



**Figure 9:** Lamelle Cytoo et chambre pour étudier la motilité des cellules hMuStem. Taille des rails 20 µm.

Le déplacement des cellules en présence et en absence de nanoparticules est étudié à J1 et J4 (J1, 1 jour post marquage ; J4, 4 jours postmarquage), ce qui fait 16 échantillons à analyser. (cf tableau 2)

Lots cellulaires	69P4	34P4	53P4	71P4
Avec Nano	J1/J4	J1/J4	J1/J4	J1/J4
Sans Nano	J1/J4	J1/J4	J1/J4	J1/J4

**Tableau 2 :** échantillons analysés en vidéomicroscopie à J1 et J4, nombre de jour postincubation.

Le microscope utilisé est un Axioobserver 2.1 commercialisé par la société Zeiss, doté d'une chambre thermostatée pour que les cellules soient alimentées avec 5% de CO<sub>2</sub> et thermostatées à 37°C. L'objectif utilisé est un objectif à sec grossissement 10X (ON:0.5 WD: 26mm). La camera utilisée est une EMCCD conçue par Rolera. Afin de paramétrer correctement l'acquisition, plusieurs critères doivent être renseignés :

-l'intervalle de temps au bout duquel l'acquisition est faite (10 minutes), le canal d'intérêt (brightfield), les régions qui seront imagées, la durée totale de l'expérience, la configuration des acquisitions afin de pouvoir bien identifier la disposition des populations, et d'ajuster le bon plan focal en z.

Un test préliminaire est réalisé pour vérifier le bon déplacement de la platine, les acquisitions en Z, avant de lancer l'expérimentation pour 24 heures. Quelques étapes de préparation des data sont nécessaires avant de pouvoir procéder aux analyses de motilité cellulaire sous image j, celles-ci sont résumées dans les annexes. Le plugin de tracking manuel développé par Fabrice Cordelière est utilisé pour analyser les distances parcourues

par les cellules hMuStem au cours du temps (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/track/ManualTrackingplugin.pdf>). Les données sont ensuite exportées et mises en forme dans excel. La mise en forme des données est indispensable pour que celles-ci soient analysées sous R par Chantal Thorin, Professeur Statisticienne à Oniris (exemple de tableau de données en annexe)

## II-1-2) Etude de l'expression des facteurs myogéniques par immunocytochimie et microscopie biphotonique

Les cellules hMuStem incubées ou non avec des nanoparticules sont cultivées pendant 4 jours en boîte de pétri 3.5 mm. A J4, les cellules sont fixées et subissent des immunomarquages pour mettre en évidence l'effet ou non des nanoparticules sur les facteurs myogéniques. Les étapes réalisées au cours des immunomarquages sont les suivantes, fixation au PFA 4% 10 min, rinçages au PBS 3X5 min, perméabilisation TX100 0.3% 20 min à 4°C, rinçage au PBS 3X5 min, saturation dans une solution de sérum de chèvre 5%



en solution de perméabilisation 1h à T° ambiante, incubation avec l'anticorps primaire 1 heure à 37°C.

Les anticorps primaires sont : l'anticorps monoclonal de souris anti pax 7 (HBANK) dilué au 1/10, l'anticorps polyclonal de lapin anti myf 5 (Réf ab125078, ABCAM) dilué au 1/200, l'anticorps monoclonal de souris anti myoD1 (Réf: M3512, DAKO) dilué au 1/10, l'anticorps monoclonal de souris anti myogénine F5D (H-BANK) dilué au 1/10. Trois rinçages de 5 min sont effectués dans le PBS et l'anticorps secondaire est incubé une heure à T° ambiante (Goat anti mouse Alexa555 pour Pax7, Myod et Myogénine – dilution 1/500 (A21424, Invitrogen), Goat anti rabbit Alexa 555 pour myf5 – dilution 1/500 (A21429, Invitrogen) ). Les cellules sont ensuite rincées et les noyaux contre colorés au DAPI (1/1000 dans de l'eau distillée, 15 min T°A). [k2]

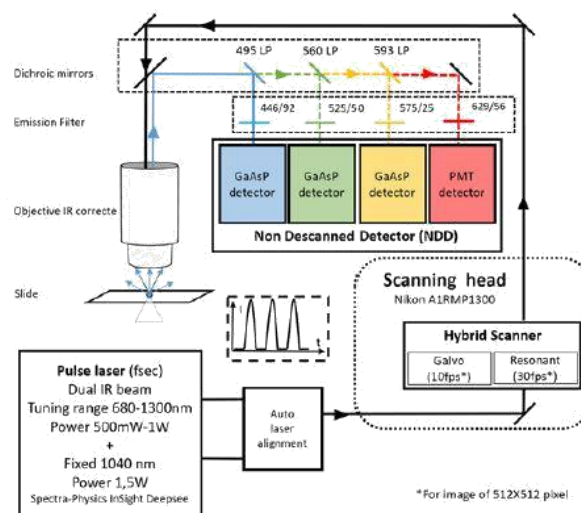
### II-1-3) Etude de la différenciation cellulaire par immunocytochimie

Les cellules hMuStem en présence ou non de nanoparticules sont cultivées dans un milieu déplété en sérum pour accélérer le mécanisme de différenciation. A J4, les cellules différenciées sont fixées au PFA 4% et immunomarquées avec l'anticorps anti myogénine (1/10) et anti myosine (MF20, H-Bank) dilué au 1/ 500<sup>[13][14]</sup><sub>[k5]</sub> en suivant le protocole décrit précédemment (Anticorps secondaire : goat anti mouse Alexa555)

### II-1-4) Observation en microscopie biphotonique des cellules<sup>[16]</sup> immunomarquées

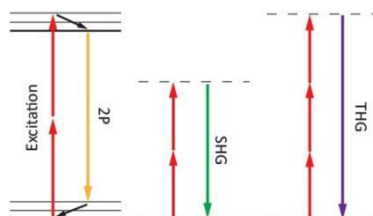
Le microscope biphotonique utilisé est un Nikon A1RMP équipé d'un laser pulsé femtoseconde Insight Deep See (680-1300 nm) doté d'une raie fixe à 1040nm. (voir figure 10) . Le microscope est équipé de 4 détecteurs non désaccablés dont 3 GaAsp et 1 PMT .

Les acquisitions ont été réalisées avec l'objectif 25X, WD=2mm, ON:1.1. Les filtres utilisés à l'émission sont (1)400-492 pour le canal bleu, (2) 500-550nm pour la canal vert, (3) 563-588nm pour le canal jaune et (4) 601-657nm pour le canal rouge (figure 10).



**Figure 10** : Microscope A1RMP Nikon de la plateforme APEX (Illustration tirée de Microscopy and Imaging Science Book, 2017 page)

En microscopie biphotonique il est possible d'accéder à plusieurs contrastes. Ainsi les photons qui viennent exciter simultanément une molécule peuvent être source de fluorescence ou source de SHG ou THG en fonction de la nature des molécules excitées comme décrit sur la figure 11.



**Figure 11** : Génération de fluorescence et de signaux harmonique à partir de l'excitation multiphotonique.

[https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockimages/technotes\\_images/nlo\\_fig\\_1.jpg](https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockimages/technotes_images/nlo_fig_1.jpg)

Le laser Insight Deepsee comporte une raie accordable entre 820 et 1300 nm et une raie fixe à 1040 nm. Les images ont été réalisées à partir d'une excitation séquentielle à 820 nm (DAPI et SHG des nanoparticules dans le canal bleu) et à 1040 nm (SHG des nanoparticules dans le canal vert et fluorescence de l'Alexa 555 dans le canal jaune). Le tableau 3 ci-dessous renseigne sur les configurations utilisées lors de l'acquisition des images présentées dans les figures 15 et 16.

Figures	$\lambda$ d'Excitation	Bleu	Vert	Jaune
13	820nm 1040nm	DAPI et SHG exc 820nm (415/10)	SHG exc 1040nm (525/50)	Al555 exc1040nm (575/25)
15	820nm 1040nm	DAPI et SHG exc820nm (415/10)	SHG exc1040nm (525/50)	Al555 exc1040nm (575/25)

**Tableau 3** : Configuration optiques utilisées pour les acquisitions des images illustrées en figures 13 et 15

Les cellules positives pour les marqueurs myogéniques sont dénombrées en réalisant un seuillage fixé à partir d'une coupe avec un marquage positif et d'une coupe contrôle négatif (absence d'anticorps secondaire).

L'automatisation de l'analyse des images a été possible grâce au développement d'une macro sur image j détaillée en annexe.

## II-2) Tracking des cellules MuStems dans le muscle de souris, 24h post administration

### II-2-1) Immunomarquage de la lamine A/C

Les sections transversales du muscle sont soumises à l'immunomarquage de la lamine A/C, protéine de la membrane nucléaire des cellules humaines. La révélation de l'immunomarquage est réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire de souris anti lamine A/C dilué au 1/500 et un anticorps secondaire de chèvre anti souris couplé à l'Alexa 555 (protocole décrit en annexe).

### II-2-2) Observation des coupes de tissus en microscopie biphotonique

Les signaux THG et SHG générés par les nanoparticules sont imagés respectivement à 1240 nm et 820 nm avec un filtre d'émission à 415/10. Pour vérifier la spécificité des signaux harmoniques les longueurs d'onde 1300 nm et 900 nm sont également testées à l'excitation donnant un signal nul à l'émission du fait que le filtre à l'émission soit très étroit 415/10.

Pour imager la SHG, la THG et l’Alexa 555 sur la même coupe, la double excitation séquentielle 1040/1300 est utilisée avec une récupération du signal émis dans le canal bleu pour la THG générée à partir de l’excitation à 1300 nm, dans le canal vert pour la SHG générée à partir de l’excitation à 1040nm, dans le canal jaune pour l’Alexa 555 à partir de l’excitation à 1040 nm, dans le canal rouge pour la SHG générée à partir de l’excitation à 1300nm (tableau 4).

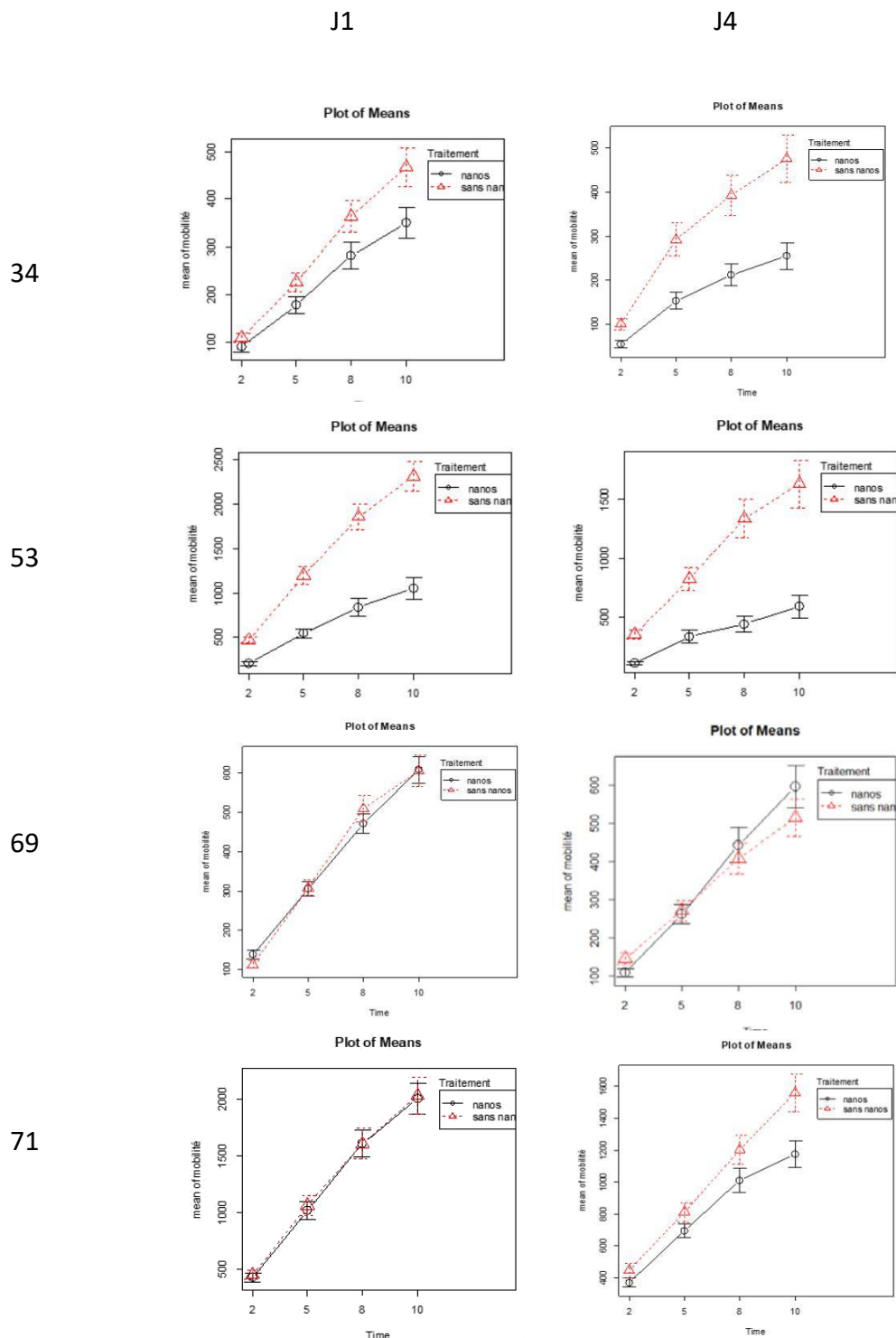
Figure 18	Excitation	Emission canal bleu	Emission canal jaune	Emission canal rouge
a, e	820nm/1040 nm	SHG 820nm (415/10)	Al555 exc 1040nm	
b et f	1240nm/1040nm	THG exc 1240nm (415/10)	Al555 exc 1040nm	SHG exc 1240nm (601/657 nm)
c	900nm/1040 nm	Pas de SHG à 900nm, filtre (415/10)		
d	1300nm/1040nm	Pas de signaux THG exc 1300nm avec (415/10)	Al555 exc 1040 nm	

**Tableau 4** : Configuration optiques utilisées pour les acquisitions des images illustrées en figure 18

## Résultats

### I) Effet des nanoparticules sur la motilité des cellules hMuStem

Les distances parcourues par les cellules hMuStem en absence et/ou en présence des nanoparticules BFO ont été analysées à t2heures, t5heures, t8heures et t10heures, pour les 4 lots cellulaires 34, 53, 69, 71 à J1 (1 jour post-incubation) et J4 (4 jours post incubation) (figure 12).



**Figure 12 :** Moyennes des distances parcourues ( $\mu\text{m}$ ) calculées à t2h, t5h, t8h, t10h pour chaque lot avec et sans nanoparticules à J1 et J4 (n=30 cellules par lot) .

L'analyse des données de biostatistique démontre que les quatre populations cellulaires ont des comportements très hétérogènes en absence et en présence des nanoparticules.

En effet, plusieurs modèles statistiques ont été testés sur R par un enseignant chercheur avec une expertise en statistique, et l'utilisation d'un modèle de régression linéaire (lme: régression linéaire de données non indépendantes) à effets mixtes s'est avérée infructueuse, à l'exception de la population 34. Pour ce modèle est calculée la somme des régressions par cellule. Pour la population 34, la pente de la droite du lot « sans nanos » est supérieure à la borne sup de l'intervalle de confiance à 95% des « avec nanos », la distance parcourue par les cellules non traitées avec les nanoparticules est donc significativement supérieure à celle des cellules traitées. Pour les autres populations, les graphes illustrent des comportements très différents selon les lots. La modélisation selon un modèle linéaire n'est pas pertinente et on peut se demander s'il existe une relation linéaire entre la distance parcourue et le temps. Pour l'analyse des données, il ne reste qu'à s'en tenir à une analyse temps par temps et réaliser les tests de comparaison des distances moyennes parcourues par les cellules (à un temps donné) dans chaque situation expérimentale (test de student).

Selon l'hypothèse nulle  $H_0$  il n'y a pas de différence significative entre les valeurs moyennes avec et sans nanoparticules ( $p > 0,005$ ). Selon l'hypothèse alternative  $H_1$  il y a une différence significative entre les moyennes avec et sans nanoparticules ( $p < 0,005$ ). Les moyennes sont comparées lot par lot avec et sans nanoparticules.

Pour les calculs du coefficient de student, la formule utilisée est la suivante:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

Où  $\bar{x}_1$  est la moyenne du groupe (exemple lot 34 sans nanoparticule à t2heures)

$\bar{x}_2$  la moyenne du second groupe (exemple lot 34 avec nanoparticules à

t2heures)  $S_1^2$  est la déviation standard du premier groupe  $S_2^2$  la déviation standard du second groupe

$N_1$  le nombre d'échantillons du premier groupe

$N_2$  le nombre d'échantillons du second groupe

Les tableaux de résultats sont dans les annexes.

Les analyses statistiques (test de student) ont été effectuées sur les distances moyennes parcourues par les cellules hMuStem à t2h, t5h, t8h et t10h avec et sans nanoparticules et ceci lot par lot en absence et/ou en présence des nanoparticules.

J1 (+J1 post incubation avec les nanoparticules)	T2h	T5h	T8h	T10h
34 avec et sans nanoparticules	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative
69 avec et sans nanoparticules	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative
53 avec et sans nanoparticules	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative
71 avec et sans nanoparticules	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative

**Tableau 5** : résultats des tests de student réalisés lot pat lot aux 4 temps, au stade J1 (1 jour post incubation avec les nanoparticules)

J4 (J+4 post incubation avec les nanoparticules)	T2h	T5h	T8h	T10h
34 avec et sans nanoparticules	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative
69 avec et sans naoparticules	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative
53 avec et sans nanoparticules	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative	P<0,005 différence significative
71 avec et sans nanoparticules	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	p>0,005 pas de différence significative	P<0,005 différence significative

**Tableau 6** : résultats des tests de student réalisés lot pat lot aux 4 temps, au stade J4 (4 jours post incobation avec les nanoparticules)

### Synthèse des résultats obtenues à l'issue des analyses statistiques

- 34** Il n'y a pas de différence significative avec et sans nano à J1, différences significatives à J4 où les cellules avec nanoparticules sont moins mobiles comparées aux cellules sans nanoparticules et ce quelque soit le temps de mesure (t2h à t10h).

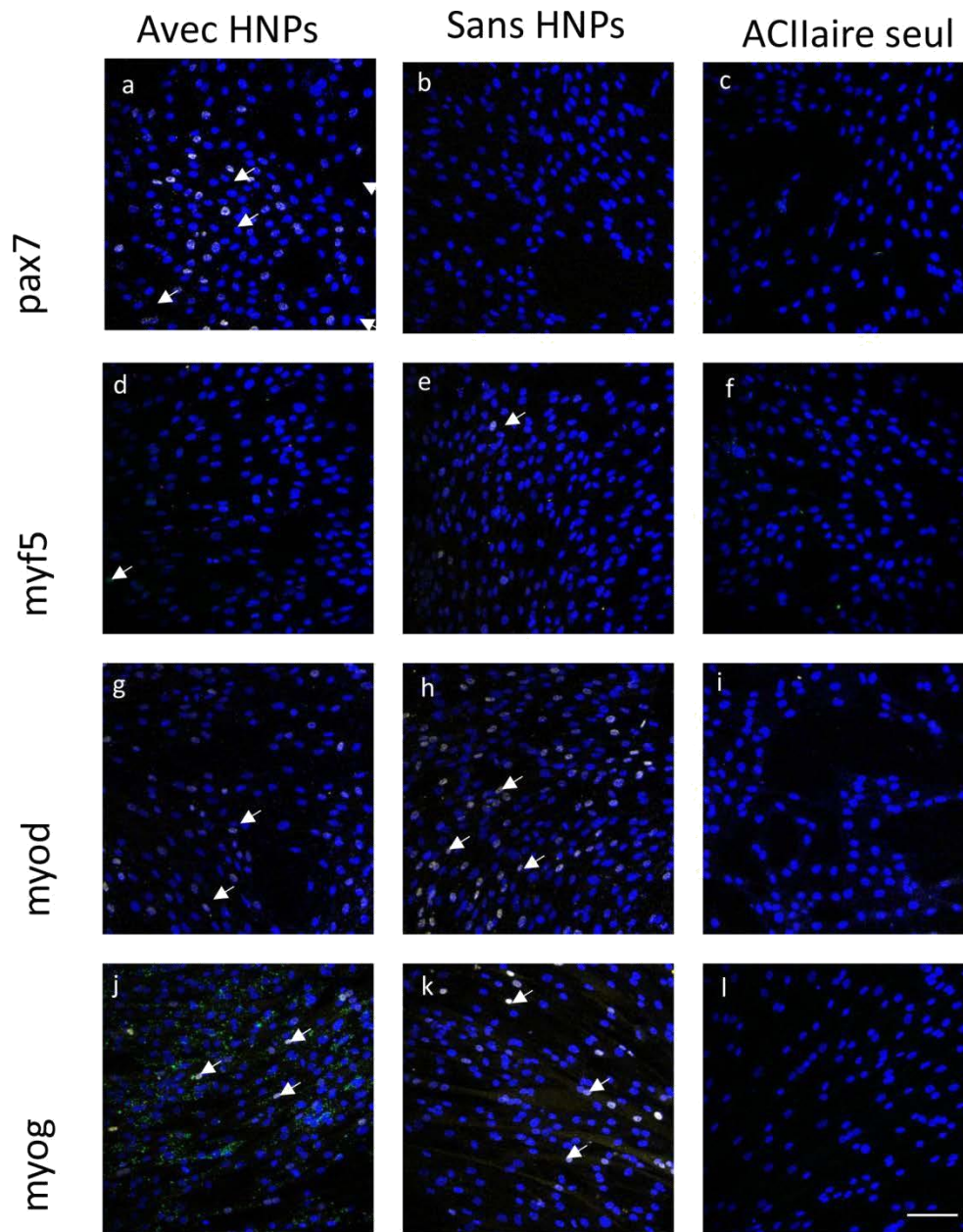
- 53** Il y a des différences significatives avec et sans nanoparticules à J1 et J4, les cellules avec nanoparticules sont moins mobiles.
- 69** Il n'y a pas de différences significatives avec et sans nanoparticules à J1 et J4.
- 71** Il n'y a pas de différences significatives à J1 et J 4 exception faite à J4 t10heures où les cellules avec nanoparticules sont moins mobiles.

Les nanoparticules ont tendance à ralentir les cellules hMuStem lorsqu'elles ont un effet significatif sur la motilité des cellules. Ce ralentissement peut atteindre un facteur 2 pour le lot cellulaire 53 dès J1. Par contre, la motilité des lots cellulaires 69 et 71 n'est pas ou peu modifiée par la présence des nanoparticules. Cet effet variable des nanoparticules sur les différents lots des cellules hMuStem ne semble pas lié à la nature des lots analysés tous issus du muscle paravertébral de jeunes donneurs sains âgés de 13 ans à 18 ans et donc susceptibles d'être très peu différents (tableau 1). Il n'est pas exclu que l'hétérogénéité de charge en nanoparticules des cellules puisse expliquer ces effets variables des nanoparticules sur la motilité des cellules. Il serait intéressant de connaître la charge en nanoparticules des cellules analysées afin de vérifier cette hypothèse. Cette expérimentation n'est pas envisageable pour le moment car le vidéomicroscope n'est pas multiphotonique et le microscope MP n'est pas équipé d'un système avec CO2 et température contrôlés. Il est également intéressant de noter que le ralentissement des cellules hMuStem par les nanoparticules est observé à J4 et non à J1. Une connaissance plus précise du temps de latence permettrait de mieux connaître l'impact des nanoparticules sur la migration des cellules hMuStem post administration in vivo. Pour cela des expériences complémentaires devront être réalisées à J2 et J3.

## II) Effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques

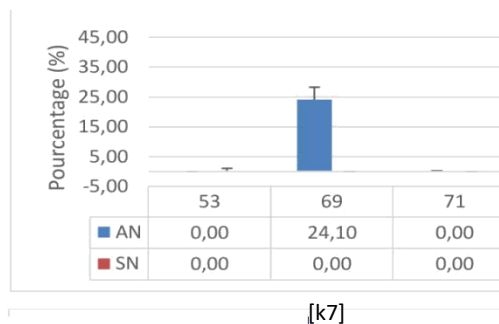
Les cellules hMuStem en présence ou non de nanoparticules sont très peu pax7 positives et très peu myf5 positives. Elles apparaissent engagées dans la voie myogénique avec un grand nombre de noyaux Myod et Myogénine positifs. La quantification des cellules positives pour les 4 facteurs myogéniques a été réalisée avec image J en utilisant un seuillage fixé pour chaque marqueur en vérifiant l'absence de signal sur les cellules contrôle non marquées. L'automatisation de l'analyse des images a été possible grâce au développement d'une macro sur image j détaillée dans l'annexe.



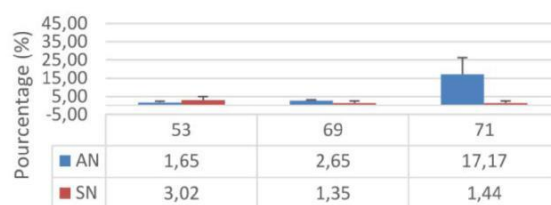


**Figure 13** a) Pax7 en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticules, b) pax7 en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule, c) contrôle sans Aclaire. d) myf5 en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticule, e) myf5 en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule, f) contrôle sans Aclaire. g) myod en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticules, h) myod en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule, i) contrôle sans Aclaire. k) myod en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticules, l) myod en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule, m) contrôle sans Aclaire. Echelle 100  $\mu$ m.

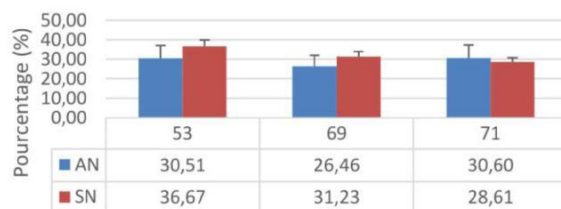
Pourcentage de cellules positives pour  
PAX7 en absence et en présence de  
nanoparticules



Pourcentage de cellules positives pour  
Myf5 en absence et en présence de  
nanoparticules



Pourcentage de cellules positives pour  
MyoD en absence et en présence de  
nanoparticules

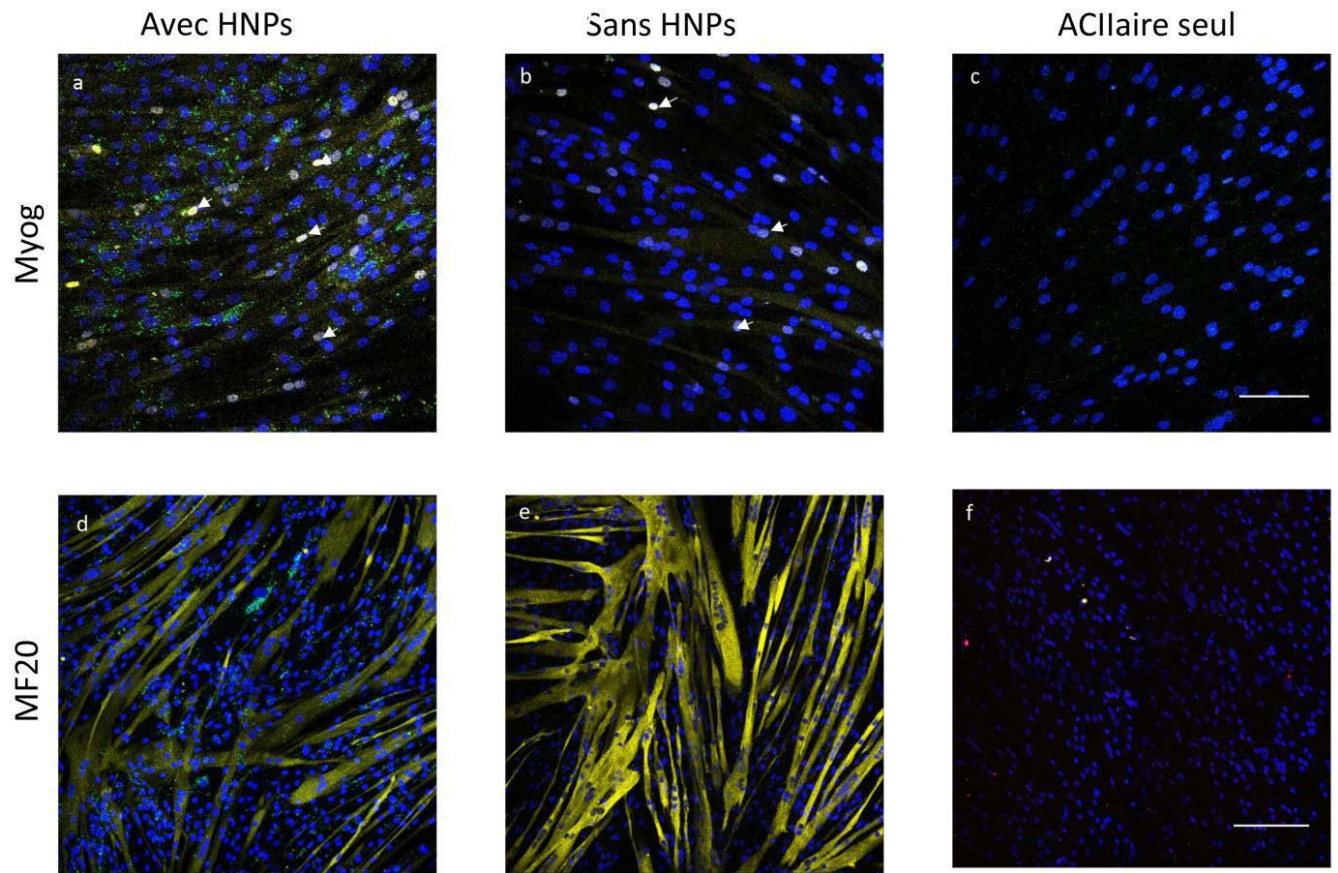


**Figure 14** : Effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques Pax7, Myf5 et MyoD. AN : avec nanoparticules, SN : sans nanoparticules.

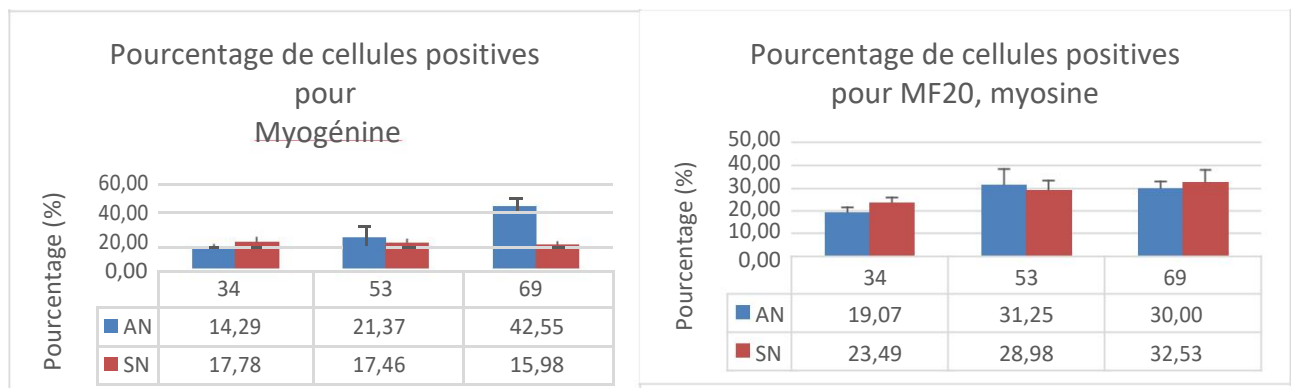
L'effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques dans les cellules hMuStem n'est pas systématique. La population 69 exprime davantage le facteur Pax7 en absence de nanoparticules alors que les autres lots cellulaires sont tous Pax7 neg avec et sans nanoparticules. La population 71 exprime davantage Myf5 en présence de nanoparticules alors qu'aucune différence n'est observée pour les autres lots. L'expression du facteur myogénique MyoD n'est pas modifiée en présence des nanoparticules.

### III) Effet des nanoparticules sur la différenciation cellulaire

L'expression de la myogénine et de la myosine sont analysées sur les cellules hMuStem différenciées et fixées à J4.



**Figure 15** a) Myogénine en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticule, b) Myogénine en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule c) contrôle sans Aclaire. d) myosine en jaune, cellules hMuStem avec nanoparticules, e) myosine en jaune, cellules hMuStem sans nanoparticule, f) contrôle sans Aclaire. Echelle 100  $\mu$ m pour Myog, 200  $\mu$ m pour MF20



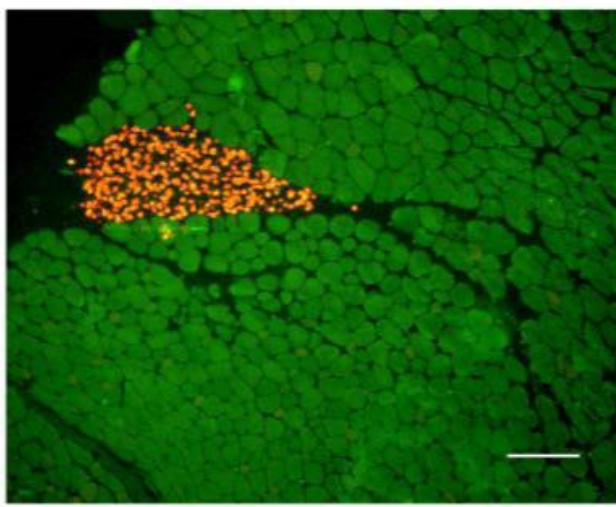
**Figure 16** : Effet des nanoparticules sur l'expression de la différenciation cellulaire. AN : avec nanoparticules, SN : sans nanoparticules.



Les nanoparticules n'ont pas d'effet significatif sur l'expression de la myogénine et de la myosine par les cellules hMuStem, exception faite pour le lot 69 qui exprime davantage la myogénine en présence de nanoparticules. Le lot 69 s'est montré également atypique dans l'expression de Pax7 en présence de nanoparticules (paragraphe précédent). Un nombre plus important de lots devra être analysé afin de conclure sur l'effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques et la différenciation des cellules hMuStem en cellules musculaires.

#### IV) Tracking des cellules hMuStem dans le muscle de souris injectées

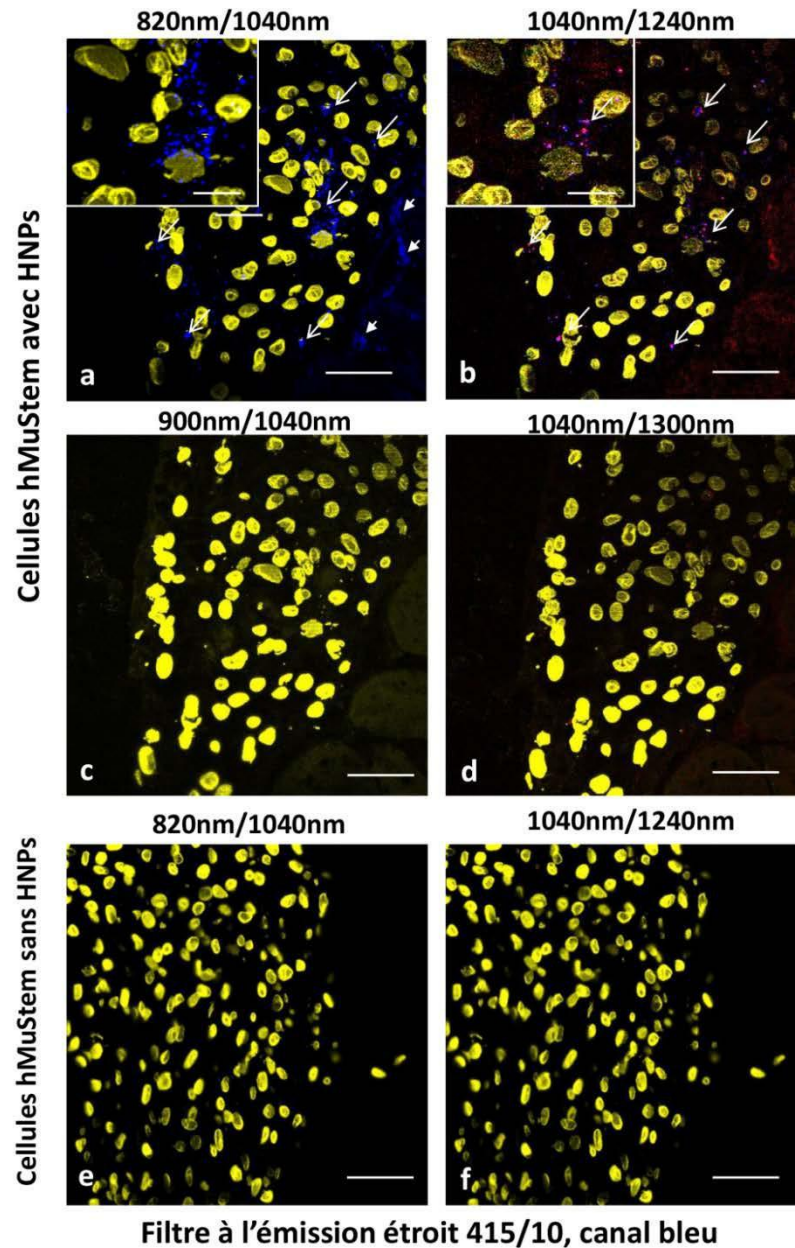
Les cellules hMuStem marquées avec les nanoparticules ont été localisées in situ dans le muscle de souris, 24 heures après leur administration intramusculaire. Les premières observations ont été réalisées en microscopie de fluorescence grâce au marquage fluorescence de la lamine A/C, marqueur spécifique des noyaux des cellules humaines (figure 17). Les cellules humaines sont regroupées en amas dans le tissu interstitiel du muscle.



**Figure 17** Coupe transversale de muscle de souris, 24 heures après l'administration intramusculaire des cellules hMuStem. Observation au microscope à fluorescence en champ large. En vert autofluorescence du muscle. En rouge, immunomarquage de la lamine A/C, protéine membranaire du noyau des cellules humaines. Echelle 200  $\mu$ m.

Les nanoparticules localisées dans les cellules hMuStem sont nettement observables dans le muscle injecté 24 heures après administration grâce à la microscopie biphotonique (figure 18). Il n'a pas été observé de différence entre la localisation

cellulaire des cellules hMuStem dans le muscle lorsqu'elles sont avec des nanoparticules (a) et sans nanoparticule (e et f).



**Figure 18** a) lamine A/C en jaune, hMuStem avec nanoparticules (SHG dans le canal bleu) b) lamine A/C en jaune, hMuStem avec nanoparticules, THG dans le canal bleu, SHG dans le canal rouge d) lamine A/C en jaune, hMuStem avec nanoparticules. Pas de SHG dans le canal bleu, Filtre d'émission trop étroit pour récupérer de la SHG à partir d'une Exc à 900 nm e) lamine A/C en jaune, hMuStem avec nanoparticules. Pas de THG dans le canal bleu, Filtre d'émission trop étroit pour récupérer de la SHG à partir d'une Exc à 1300 nm f) contrôle sans nanoparticules Exc 820nm pour imager la SHG récoltée dans le filtre 415/10, absence de nanoparticules, pas de signal dans le canal bleu g) contrôle sans nanoparticules Exc 1240nm pour imager la THG récoltée dans le filtre 415/10, absence de nanoparticules, pas de signal dans le canal bleu Echelle x  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

Pour qu'un agent de thérapie cellulaire puisse être proposé en clinique, il est nécessaire de connaître parfaitement ses propriétés de prolifération, différenciation et sa biodistribution dans les tissus suite à son administration afin d'évaluer objectivement le potentiel thérapeutique de l'agent et de connaître son éventuel toxicité. À cette fin, le développement de technologies d'imagerie non invasives et puissantes en termes de seuil de détection et de stabilité est nécessaire pour surmonter le manque actuel d'outils efficaces. Les potentialités des nanoparticules ont bénéficié ces dernières années d'une grande attention de par leurs propriétés attrayantes en termes de sensibilité, de spécificité et de stabilité, permettant un suivi à long terme (quantum dot, nanofluomag, nanocristaux harmoniques ect ..) La haute résolution associée aux techniques optiques et notamment à la microscopie non linéaire représente un atout majeur pour les études de tracking in vivo chez le petit animal notamment parce que la microscopie non linéaire est associée à l'imagerie du vivant du fait de sa faible phototoxicité mais également parce que le rayonnement infra-rouge permet une imagerie en profondeur. C'est dans ce contexte que le marquage des cellules hMuStem isolées par l'équipe de Karl Rouger a été réalisé avec les nanoparticules BFO harmoniques développées par Luigi Bonacina et qu'il a pu être démontré qu'il était possible d'imager les cellules marquées, in situ dans le muscle de souris, 24 heures après leur administration (Dubreil et al., 2017).

Ce marquage des hMuStem est essentiel pour connaître leur biodistribution mais il est également indispensable de s'assurer que les nanoparticules ne modifient pas ou peu les propriétés de hMustem. Le travail réalisé dans le cadre de ce stage de Master2 a consisté à mettre au point des outils afin d'étudier l'effet des nanoparticules sur la motilité des cellules hMuStem, leur engagement dans la voie myogénique et leur différenciation en cellules musculaires. Le protocole mis au point en vidéomicroscopie pour suivre la motilité des cellules avec et sans nanoparticules a permis de montrer que dans 75% des cas les nanoparticules harmoniques modifiaient peu ou pas la motilité des cellules hMuStem 24 heures après leur marquage. Ainsi, 3 lots cellulaires sur les 4 analysés, ne montrent pas d'effet significatif des nanoparticules sur la motilité des cellules hMuStem marquées.

. Le 4<sup>ème</sup> lot cellulaire qui se distingue des 3 autres voit par contre sa motilité diminuée d'un facteur 2 en présence de nanoparticules à J1. C'est une information à ne pas négliger et qu'il faudra confirmer sur un plus grand nombre de lots cellulaires. Cet effet de ralentissement des nanoparticules sur la motilité des cellules confirmé à J4 pour 2 lots sur les 4 peut avoir des conséquences majeures sur la dissémination des hMuStem marquées et administrées in vivo chez l'animal.

Un lot cellulaire sur 3 exprime davantage Pax7 en présence de nanoparticules. De même un lot sur trois exprime davantage Myf5 en présence de nanoparticules alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les cellules marquées et non marquées concernant l'expression de MyoD. Cet effet des nanoparticules sur l'expression des facteurs myogéniques des cellules hMuStem est un élément important à considérer qu'il faudra confirmer sur un plus grand nombre de lots du fait de l'hétérogénéité des résultats. En effet, l'accélération ou le retardement de l'engagement myogénique des cellules marquées peut être un indicateur de la modification du comportement des cellules marquées et constitué un critère éliminatoire pour l'utilisation des nanoparticules BFO .

En revanche, les nanoparticules harmoniques ne semblent pas altérer les propriétés de différenciation cellulaire des hMuStem en cellules musculaires. En effet, les expériences réalisées en milieu de culture déplété en sérum ont montré qu'il y avait aucune différence significative sur le niveau d'expression de la myogénine et de la myosine entre les cellules marquées et non marquées. Ces données en faveur de la neutralité des nanoparticules vis-à-vis des cellules hMuStem devront également être confirmées sur un plus grand nombre de lots.

## Conclusion

Ainsi les outils développés en microscopie et en analyse d'image au cours de ce stage, permettent d'analyser la motilité des cellules hMuStem, l'expression des facteurs myogéniques (de Pax7 à MyoD), la différenciation des cellules en cellules musculaires et la localisation des cellules hMuStem in situ dans le muscle de souris, ceci en présence ou non de nanoparticules. Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules n'ont pas strictement le même effet suivant les lots de cellules hMuStem analysés. Aux vues de ces résultats, Il apparait indispensable d'analyser un plus grand nombre de lots cellulaires de hMuStem avant de conclure sur la neutralité ou les effets que pourraient avoir les nanoparticules sur les cellules marquées. Il apparait également important de déterminer si la différence observée entre les lots (motilité, expression des facteurs myogéniques) est liée à une différence de charge en nanoparticules dans les cellules. Enfin les études de localisation cellulaire in situ dans le muscle devront être effectuées à plus de 1 jour post administration. Pour cela, des souris immunodéprimées seront injectées avec des cellules hMuStem marquées avec les nanoparticules et les prélèvements musculaires seront effectués 1 mois post administration. Des suivis de la biodistribution des cellules marquées pourront être également envisagés à plus long terme chez la souris en utilisant les techniques de microscopie biphotonique en intravital.



## References Bibliographiques

Bonacina L. Nonlinear nanomedicine: harmonic nanoparticles toward targeted diagnosis and therapy. *Mol Pharm*. 2013 Mar 4;10(3):783-92.

Débarre D., Pena AM., Supatto W., Boulesteix T., Strupler M., Sauviat MP., Martin JL., Schanne-Klein MC., Beaurepaire E. Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues. *Med Sci (Paris)*. 2006 Oct;22(10):845-50.

Dubreil L., Ledevin M., Lovo C., Larcher T., Fleurisson R., Guigand L. and Rouger K.. Multiphotonic and Harmonic generation microscopy: an attractive label free imaging and non-destructive observation of collagenic and adipose tissues in pathological muscle context. *Microscopy and imaging science, Microscopy Book series #7*, 2017 Editor: A. Méndez-Vilas p293-299

Dubreil L., Leroux I., Ledevin M., Schleder C., Lagalice L., Lovo C., Fleurisson R., Passemard S., Kilin V., Gerber-Lemaire S., Colle MA., Bonacina L., Rouger K. Multi-harmonic Imaging in the Second Near-Infrared Window of Nanoparticle-Labeled Stem Cells as a Monitoring Tool in Tissue Depth. *ACS Nano*. 2017 Jul 25;11(7):6672-6681. doi: 10.1021/acsnano.7b00773. Epub 2017 Jun 27.

Govoni A, Magri F., Brajkovic S., Zanetta C., Faravelli I., Corti S., Bresolin N., Comi GP. Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Dec;70(23):4585-602.

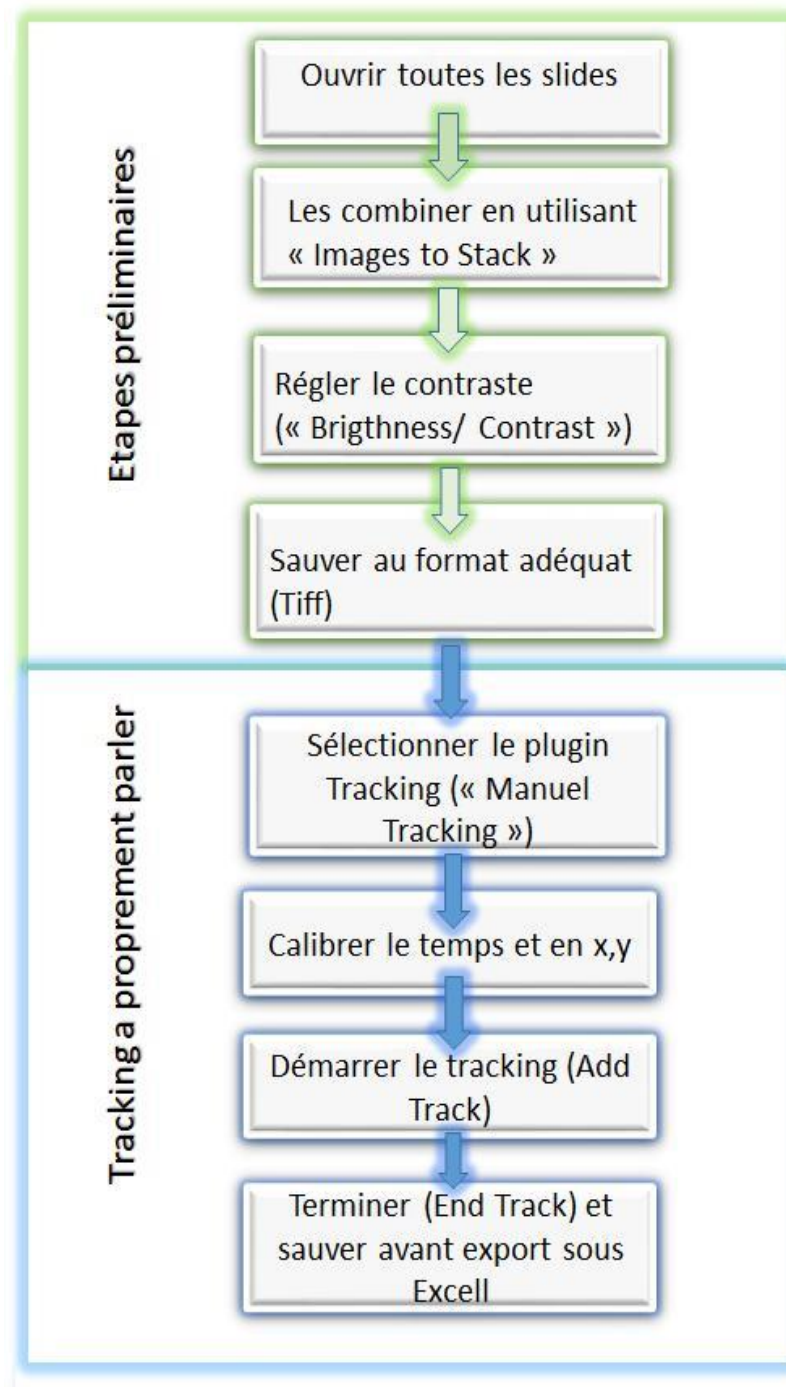
Rouger K, Larcher T, Dubreil L, Deschamps JY, Le Guiner C, Jouvion G, Delorme B, Lieubeau B, Carlus M, Fornasari B, Theret M, Orlando P, Ledevin M, Zuber C, Leroux I, Deleau S, Guigand L, Testault I, Le Rumeur E, Fisman M, Chérel Y. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol*. 2011 Nov;179(5):2501-18.

Staedler D., Passemard S., Magouroux T., Rogov A., Maguire CM., Mohamed BM., Schwung S., Rytz D., Jüstel T., Hwu S., Mugnier Y., Le Dantec R., Volkov Y., Gerber-Lemaire S., Prina-Mello A., Bonacina L., Wolf JP. Cellular uptake and biocompatibility of bismuth ferrite harmonic advanced nanoparticles. *Nanomedicine*. 2015 May;11(4):815-24.

Wang YX, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Molecular regulation of determination in asymmetrically dividing muscle stem cells. *Cell Cycle*. 2013 Jan 1;12(1):3-4.

## Annexes

### Etapes à réaliser sous image J pour procéder au Tracking cellulaire via le plugin de tracking manuel



## Exemple de tableaux de données mises en forme pour l'analyse statistique

REFERENCE	LOT	Traitement	temps	mobilité	jours
C1	53p4	nanos	2	77	j1
C1	53p4	nanos	5	465	j1
C1	53p4	nanos	8	1176	j1
C1	53p4	nanos	10	1830	j1
C2	53p4	nanos	2	534,152	j1
C2	53p4	nanos	5	1413,403	j1
C2	53p4	nanos	8	2355,258	j1
C2	53p4	nanos	10	2636,177	j1
C3	53p4	nanos	2	364,041	j1
C3	53p4	nanos	5	943,344	j1
C3	53p4	nanos	8	1759,714	j1
C3	53p4	nanos	10	2388,591	j1
C4	53p4	nanos	2	234,354	j1
C4	53p4	nanos	5	499,256	j1
C4	53p4	nanos	8	618,404	j1
C4	53p4	nanos	10	734,032	j1
C5	53p4	nanos	2	150,3	j1
C5	53p4	nanos	5	382	j1
C5	53p4	nanos	8	599,29	j1
C5	53p4	nanos	10	755,35	j1
C6	53p4	nanos	2	166,011	j1
C6	53p4	nanos	5	509,573	j1
C6	53p4	nanos	8	614,3	j1
C6	53p4	nanos	10	781,343	j1
C7	53p4	nanos	2	278,981	j1
C7	53p4	nanos	5	792,976	j1
C7	53p4	nanos	8	1135,697	j1
C7	53p4	nanos	10	1256,253	j1
C8	53p4	nanos	2	118,419	j1
C8	53p4	nanos	5	343,235	j1

## Analyses statistiques des données Cytoo

### Résultat du test de student pour la population 53 J1:

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	-6,37952757	1,6008E-08	30
	5	-5,70502403	2,077E-07	30
	8	-5,71269305	2,018E-07	30
	10	-5,87393132	1,0988E-07	30

#### Résultats pour la population 53 J4

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	-5,62269173	2,8286E-07	30
	5	-4,45262675	1,9587E-05	30
	8	-5,00911815	2,718E-06	30
	10	-4,62374177	1,0772E-05	30

#### Résultats du test de student pour la population 69 j1

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	1,68619892	0,04856512	30
	5	-0,09386446	0,46277017	30
	8	-0,916971493	0,18147742	30
	10	0,062126133	0,475337993	30

#### Résultats du test de student pour la population 69 j4

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	-0,35853929	0,36062078	30
	5	1,03312355	0,15291739	30
	8	1,30386095	0,09871617	30
	10	1,53028347	0,06569143	30

Tout comme dans la population précédente l'hypothèse  $H_0$  est rejetée, il y a donc une différence significative entre les deux populations en présence de nanoparticules

Résultats pop 71 j 1

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	-0,42422552	0,33648538	30
	5	-0,39590374	0,34681434	30
	8	0,00720196	0,49713922	30
	10	-0,13715366	0,44569217	30

Résultats pop 71 j4

Traitement		Test Student unilatéral		
Nanos/sans nanos	Temps	t-value	p-value	data:n
	2	-1,50110394	0,0693767	30
	5	-1,53492001	0,06512045	30
	8	-1,62391188	0,05490881	30
	10	-2,63048856	0,0054508	30

# Etude : NanoInVivo

## Immuno-marquage Lamin A/C

### Lames congelées - Fluo

Anti-lamin A/C monoclonal de lapin (Abcam, Ab108595)

17.0270 TAd	lame 1, 21, 41	Souris injectée MuStem + nano
17.0270 TAdg	lame 1, 21	Souris injectée MuStem
Muscle de chien	Témoin positif Lam A/C	

#### 1. Coupe

Décongeler les lames ..... 1 h, TA

Entourer les prélèvements au Dako Pen

Immerger les lames dans du PBS ..... 5 min

#### 2. Perméabilisation

Triton X100 à 0,3% dans PBS ..... 10 min, T°A

Rincer dans du PBS ..... 3 x 5 min, T°A

#### 3. Saturation

#### 4. Incubation de l'anticorps primaire

Monoclonal Ig G de lapin anti Lamin A/C dilué au 1/500

Diluant : solution de saturation

Incuber ..... 1 h, 37°C

Rincer dans du PBS ..... 3 x 5 min, T°A

#### 5. Incubation ACIIaire

Invitrogen)

Dilution 1/300 dans du PBS

Incuber ..... 1 heure, T°A

Lavage PBS ..... 3x5 min, T°A

#### 6. Contre coloration

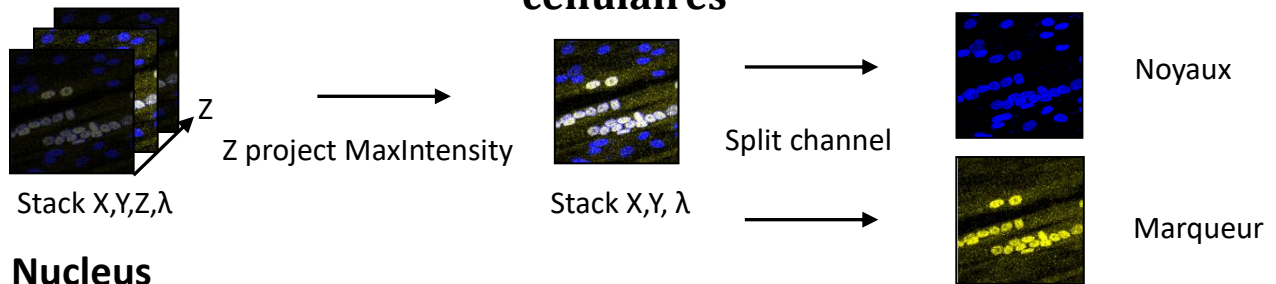
DRAQ5 dilution au 1/1000

..... 15 min, T°A

Lavage PBS ..... 3x5 min, T°A

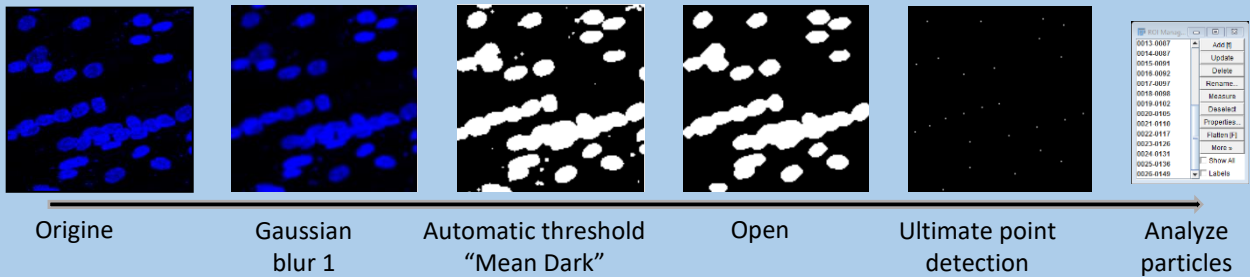
#### 7. Montage des lames

## Processus d'analyse des différents marqueurs cellulaires

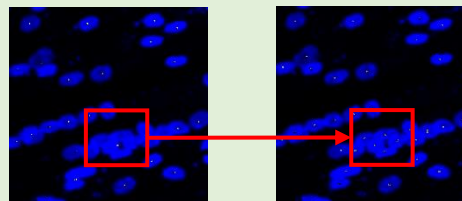


### Nucleus

#### Automatic



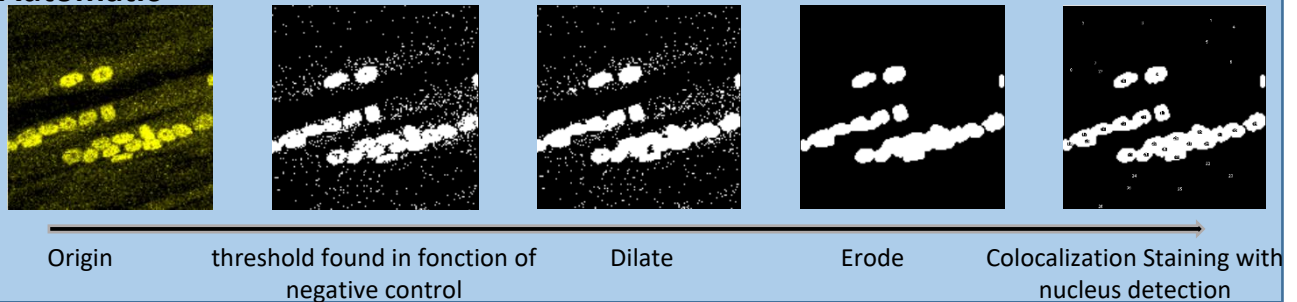
#### Manual Correction



- Add nucleus
- Center on nucleus
- Delete miss match

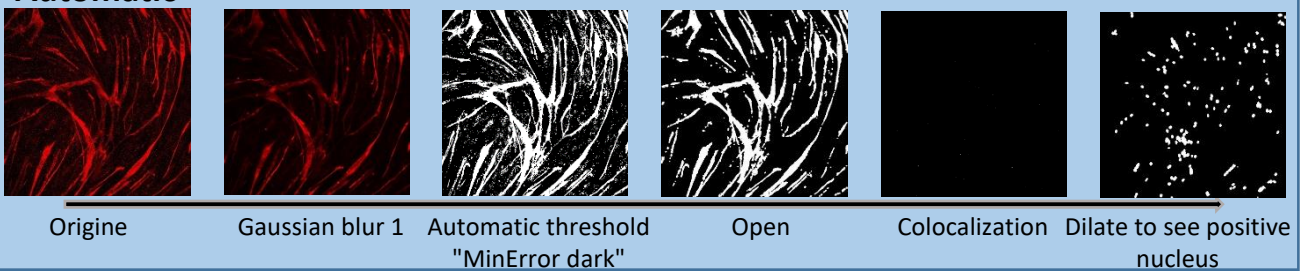
### Nucleus staining

#### Automatic

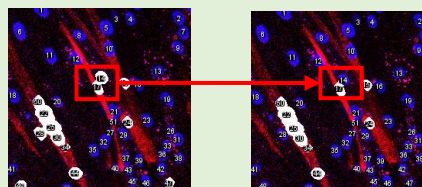


### Cytoplasmic staining

#### Automatic



#### Manual Correction



- Delete miss match





